



**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

09/601513



REC'D 15 JUN 1999

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. MI98 A 000197

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY DOCUMENT**

15 FEB. 1999

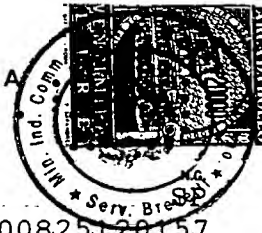
Roma, li .....

**IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE**

D.ssa Maria Luisa FOCA

*Maria Luisa Foca*

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO. MODULO A  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCA. ROMA  
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE. DEPOSITO RISERVE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **BRACCO S.p.A.** codice **00825120157**  
Residenza **Milano**  
2) Denominazione \_\_\_\_\_  
Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome **Bianchetti Giuseppe ed altri** cod. fiscale \_\_\_\_\_  
denominazione studio di appartenenza **Bianchetti - Bracco - Minoja s.r.l.**  
via **Rossini** n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

D. TITOLO

classe proposta sez cl sci) **C12Q** gruppo sottogruppo **1 00**

"Metodo per la determinazione di infezioni da protesi"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_

N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **Thaller Maria Cristina** 3) **Selan Laura**  
2) **Rossolini Gian Maria** 4) **Passariello Claudio**

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1)

2)

G. CENTRO ASILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

**002 DSM DEUTSCHE SAMMLUNG**

**VON MIKROORGANISMEN (DSM) (GERMANIA)**

H. ANNOTAZIONI SPECIALI



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **1** PROV n. pag. **18** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)  
Doc. 2) **0** PROV n. tav. disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)  
Doc. 3) **1** RIS lettera d'incarico, pro ~~XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX~~  
Doc. 4) **0** RIS designazione inventore  
Doc. 5) **0** RIS documenti di priorità con traduzione in italiano  
Doc. 6) **0** RIS autorizzazione o atto di cessione  
Doc. 7) **0** nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

confronta singole priorità

3) attestati di versamento, totale lire **trecentosessantacinquemila#**

obbligatorio

COMPILATO IL **03 02 1998**

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

**Minoja Fabrizio**

CONTINUA S/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO **SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

**milano**

codice **15**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

**MI98A 000197**

Reg. A

L'anno millenovecento

**NOVANTOTTO**

, il giorno

**TRE**

, del mese di

**FEBBRAIO**

il (i) richiedente (i) sopraindicato (i) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredate di n.

**00** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE  
**Biglin Michele**

timbro  
dell'ufficio

UFFICIALE ROGANTE  
**CORTONESI MAURIZIO**

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

M198A00197

REG. A

DATA DI DEPOSITO

23/02/1998

DATA DI RILASCIO

NUMERO BREVETTO

## A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

## D. TITOLO

"Metodo per la determinazione di infezioni da protesi"

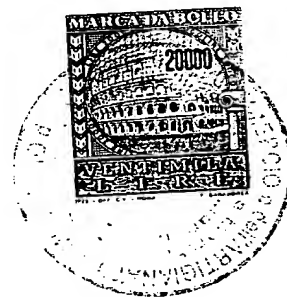
Classe proposta (sez.:cl. scl.)

(gruppo sottogruppi)

## L. RIASSUNTO

Viene descritto un metodo per la determinazione di infezioni da protesi che consiste in un saggio immunochimico diretto alla rivelazione di anticorpi contro il polisaccaride prodotto dai batteri infettanti la protesi, presenti nei fluidi biologici dei pazienti.

A. DISEGNO



5114 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

PB/ac "METODO PER LA DETERMINAZIONE DI INFEZIONI DA PROTESI"

a nome : BRACCO S.p.A.

MI 98 A 019 7

con sede in: Milano

\* \* \*

3 FEB. 1998

La presente invenzione si riferisce ad un metodo per la determinazione di infezioni da protesi condotto su campioni di sangue o altri fluidi biologici, caratterizzato dal fatto che viene determinata la presenza nel campione in esame di anticorpi diretti contro il polisaccaride prodotto da ceppi virulenti di stafilococco.

L'invenzione inoltre fornisce un metodo per la preparazione del polisaccaride a partire da colture di stafilococchi virulenti, e lo stesso polisaccaride ottenibile secondo il nuovo metodo.

Le infezioni protesiche rappresentano un grave problema nella chirurgia generale, cardiovascolare, ortopedica, nell'oculistica e nell'odontoiatria, settori in cui l'introduzione di biomateriali è divenuta procedura di routine.

Le protesi mediche trovano estesa applicazione anche in campo oncologico per la nutrizione parenterale e per la chemioterapia.

Gli aspetti più significativi che caratterizzano le infezioni da protesi sono i seguenti:

- l'incidenza delle infezioni è fra il 2 e il 6% dei casi, dopo la prima introduzione della protesi;
- nel caso in cui la protesi venga sostituita per infezione, l'incidenza delle reinfezioni è circa del 60%;

- le infezioni possono causare la perdita funzionale di organi o loro porzioni o anche la morte del paziente in una percentuale di casi che varia fra il 25 e il 45%, sebbene in talune branche, quale ad esempio la cardiocirurgia, la mortalità sia più elevata;
- l'ospedalizzazione dei pazienti è spesso molto lunga e costosa;
- la diagnosi delle infezioni è difficile per le quasi completa assenza di segni clinici obiettivi specifici e conclamati;
- in quasi tutti i casi di infezione si ritrovano gli stafilococchi, coagulasi positivi e negativi, oltre ad alcuni gram negativi come Pseudomonas aeruginosa ed altri microorganismi come gli enterococchi.

Nelle infezioni da protesi i batteri aderiscono con forza alla superficie dei biomateriali, formano colonie e successivamente biofilm batterici che possono ricoprire quasi per intero la superficie del biomateriale.

Dopo l'adesione, i batteri subiscono delle modificazioni metaboliche, riducono il ritmo di replicazione ed iniziano una intensa attività biosintetica, soprattutto di biosintesi dei polisaccaridi extracellulari. I polisaccaridi formano una fitta rete che permette di concentrare sali e nutrienti e di costituire una barriera contro agenti chimici, radiazioni, cellule e anticorpi.

I batteri che formano polisaccaride, quando crescono adesi al biomateriale, possono dare valori di MIC (Concentrazione inibitoria minima) e MBC (Concentrazione battericida minima) fino a 100 volte superiori a quelli cresciuti, in assenza del biomateriale, senza produzione di polisaccaride.

Quando il biofilm raggiunge una massa critica, rilascia nel mezzo liquido emboli di cellule che possono colonizzare ed infettare nuove superfici del biomateriale.

La sintomatologia connessa con le infezioni delle protesi è poco evidente; spesso i sintomi vengono attribuiti a forme influenzali e recedono rapidamente in seguito a comuni terapie antibiotiche per tornare a ripresentarsi a distanza di tempo.

I sintomi diventano evidenti in fase avanzata della malattia, quando compaiono grosse tumefazioni dei tessuti molli periprotetici o fistole, o gravi segni di compromissione generale.

La diagnosi delle infezioni è difficile per la ridotta e incerta sintomatologia, ed anche per il fatto che spesso nelle analisi microbiologiche colturali si hanno falsi negativi dovuti alla incapacità dei batteri di adattarsi in tempi brevi alle condizioni di crescita in vitro.

Fino ad ora, la diagnosi delle infezioni a carico di protesi vascolari si è basata sull'analisi dei parametri clinici obiettivi, di parametri emato-chimici aspecifici, su esami strumentali quali ecografia, tomografia computerizzata, risonanza magnetica nucleare, esofago-gastro-duodenoscopia, e scintigrafia dopo somministrazione di leucociti marcati con traccianti radioattivi. Questi esami non permettono il più delle volte di rivelare lo stadio iniziale della malattia o di interpretare in maniera precisa i risultati per limiti dovuti alla tecnica impiegata.

In definitiva, le attuali possibilità diagnostiche sono

assolutamente inadeguate nelle fasi che più favorevolmente potrebbero essere affrontate da un punto di vista terapeutico.

Si è ora trovato, ed è oggetto della presente invenzione, un metodo facilmente applicabile a campioni di sangue o ad altri fluidi biologici, attendibile ed economico, in grado di individuare la presenza dell'infezione a carico delle protesi anche nelle fasi iniziali, eseguibile in maniera routinaria permettendo così il monitoraggio costante dei pazienti, adatto alla diagnosi di infezioni a carico di qualsiasi materiale protesico.

Il metodo consiste nella determinazione di anticorpi diretti contro un polisaccaride ottenuto da ceppi virulenti di stafilococchi; l'invenzione fornisce inoltre un metodo per la preparazione di detto polisaccaride.

Ceppi di stafilococchi idonei per il metodo qui descritto sono quelli coagulasi positivi o negativi, virulenti, ovvero in grado di produrre glicocalice o quello che spesso viene indicato col termine "slime". Sono preferiti i ceppi virulenti di Staphylococcus epidermidis o di altre specie coagulasi positive e negative.

Tali ceppi possono essere ottenuti direttamente da pazienti affetti da infezioni da protesi. La caratterizzazione di un ceppo tipico avente le suddette caratteristiche è mostrato nell'Esempio 1 che segue. Le prove hanno dato risultati particolarmente favorevoli con il ceppo depositato alla DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) n. 11942.

I microorganismi vengono coltivati nel terreno descritto in Hussain et al., J. Med. Microbiol. 34:143-147, 1991 (terreno HHW), con alcune



modifiche, come riportato di seguito nell'Esempio 2.

Il procedimento di preparazione del polisaccaride secondo l'invenzione comprende essenzialmente i seguenti passaggi:

- a- coltura dei microorganismi nel terreno HHW modificato secondo quanto specificato sopra, per un periodo variabile di 4-6 giorni.
- b- omogeneizzazione delle cellule in tampone fisiologico
- c- centrifugazione a 13.000 x g per 15 min e separazione del surnatante
- d- dialisi del surnatante con membrane a "cut-off" di 12 kDa
- e- congelamento della soluzione ottenuta al punto (d) seguita da liofilizzazione della stessa
- f- risospensione del liofilizzato in soluzione di acido tricloroacetico
- g- centrifugazione a 30.000 x g della soluzione ottenuta al punto (f), separazione del surnatante e aggiunta di etanolo allo stesso
- h- centrifugazione del surnatante trattato del punto (g) a 20.000 x g a dare il polisaccaride grezzo
- i- lavaggio del polisaccaride grezzo con etanolo assoluto, essiccamento sotto vuoto e risospensione in H<sub>2</sub>O sterile
- ed, eventualmente,
- l- quantificazione del polisaccaride.

Quest'ultimo passaggio può essere condotto per esempio secondo quanto descritto in PELKONEN et al., Journal of Bacteriology 170, 2646, 1988.

Il polisaccaride ottenibile con il procedimento descritto viene usato nel saggio per la determinazione degli anticorpi presenti nel sangue o in altro fluido biologico di pazienti portatori di protesi.



Preferibilmente, il saggio determina la presenza degli anticorpi IgG e IgM, ed è di tipo immunochimico convenzionale, per esempio ELISA, immunoprecipitazione in gel, immunodiffusione o controimmuno-elettroforesi, radioimmunologico (RIA), fissazione del complemento.

E' preferito un metodo in fase solida in cui il polisaccaride viene fatto aderire ad un supporto, per esempio pozzetti da microtitolazione, e in seguito viene lasciato reagire con il campione da analizzare, in condizioni idonee alla formazione di un immunocomplesso; il complesso così formato può essere rivelato per reazione con opportune molecole quali per esempio anticorpi o loro frammenti attivi marcati con isotopi radioattivi, chemiluminescenti, fluorogeni, o accoppiati con enzimi che catalizzano reazioni colorimetriche, e simili.

L'efficacia del metodo dell'invenzione è stata confermata in una prova di confronto dell'immunoreattività di campioni da pazienti con infezioni da protesi, verso il polisaccaride descritto, rispetto all'immunoreattività verso i seguenti antigeni:

- biofilm monospecifici di diversi ceppi di stafilococco (sia ceppi di riferimento che ceppi di isolamento clinico) formati su piccoli supporti di polipropilene di forma cilindrica (0,5x1 mm);
- biofilm polispecifici di diversi ceppi di stafilococco (sia ceppi di riferimento che ceppi di isolamento clinico) formati su piccoli supporti di polipropilene di forma cilindrica (0,5x1 mm);
- proteine di superficie estratte da colture di diversi ceppi di stafilococco.

In questa prova di confronto sono stati utilizzati sieri

provenienti da 15 pazienti portatori di protesi vascolare, per i quali era stata accertata la presenza di infezione mediante analisi microbiologica di campioni prelevati dai siti infetti e successivamente mediante l'analisi microbiologica della protesi dopo l'espianto. Di questi 15 pazienti, 11 presentavano infezione conclamata, 4 risultavano positivi all'esame scintigrafico con leucociti marcati con  $^{99}\text{Tc}$ , mentre gli altri rilevamenti clinici erano negativi. All'analisi microbiologica in tutte le infezioni è stato trovato almeno un ceppo di stafilococco.

Come controlli negativi sono stati utilizzati sieri provenienti da 10 soggetti adulti sani di ambo i sessi.

La prova ha dato i seguenti risultati:

- i tassi anticorpali di IgG e IgM, nei confronti di biofilm monospecifici e polispecifici non consentono di differenziare fra pazienti infetti e controlli negativi;
  - i tassi anticorpali di IgG e IgM verso le proteine di superficie permettono di distinguere tra pazienti infetti e controlli negativi in maniera statisticamente non significativa;
  - i tassi anticorpali di IgG e IgM verso il polisaccaride dell'invenzione permettono di distinguere in maniera significativa tra soggetti infetti o con scintigrafia positiva, ma senza segni chiari di infezione, rispetto a soggetti sani, sia per quanto riguarda le IgG che le IgM, come si vede nelle successive due tabelle, nelle quali vengono riportati sia i valori ottenuti che il calcolo della significatività statistica dei dati (T Student).
-

DSM 11942						
	IgG 1/160	IgG 1/160	IgG 1/160	IgM 1/160	IgM 1/160	IgM 1/160
	Intervallo	Media	Dev. St.	Intervallo	Media	Dev. St.
Pr. infetti (11)	0,262-1,06	0,66	0,25	0,32-1,032	0,66	0,22
Pr. negativi (10)	0,177-0,226	0,17	0,03	0,101-0,195	0,14	0,04
Pr. scint. + (4)	0,251-0,457	0,32	0,09	0,332-0,56	0,47	0,09

SA1545						
	IgG 1/160	IgG 1/160	IgG 1/160	IgM 1/160	IgM 1/160	IgM 1/160
	Intervallo	Media	Dev. St.	Intervallo	Media	Dev. St.
Pr. infetti (11)	0,173-0,971	0,42	0,21	0,31-1,071	0,56	0,2
Pr. negativi (10)	0,11-0,265	0,15	0,05	0,126-0,243	0,16	0,03
Pr. scint. + (4)	0,202-0,445	0,29	0,11	0,267-0,483	0,37	0,08



DSM 11942 indica il ceppo descritto in precedenza, mentre SA1545 indica un ceppo di Staphylococcus epidermidis isolato da protesi e caratterizzato come riportato nell'Esempio 1.

IgG-IgM 1/160 indicano la diluizione di sieri.

Dalle tabelle si può chiaramente notare che i soggetti infetti presentano in tutti i casi anticorpi IgG e IgM più alti rispetto ai soggetti sani di controllo.

La differenza, statisticamente significativa, permette di stabilire un valore soglia oltre il quale sia possibile definire un processo infettivo in atto, con alte probabilità. E' altresì possibile monitorare

il paziente prima della protesizzazione ed utilizzare il tasso anticorpale ottenuto come valore di riferimento per le successive determinazioni.

E' chiaro che il metodo descritto offre grandi vantaggi per la facilità di esecuzione, per l'economicità e soprattutto per la possibilità di avere riscontri attendibili (senza necessità di procedure invasive) nelle fasi iniziali dell'infezione, quando gli altri metodi in molti casi danno risultati incerti; inoltre permette di monitorare l'eventuale insorgenza di infezioni latenti e l'andamento della terapia.

L'invenzione infine si riferisce ad un kit per l'esecuzione del saggio, contenente il polisaccaride, gli anticorpi o i reagenti di rivelazione, in opportuni contenitori insieme a veicoli, eccipienti, additivi in grado di preservarne la stabilità.

Preferibilmente, il kit conterrà strip pre-sensibilizzate con l'antigene e i sieri di controllo positivo e negativo (titolati).

Gli esempi che seguono servono a chiarire in maggior dettaglio l'invenzione.

Esempio 1 - Preparazione e caratterizzazione di un ceppo batterico idoneo per il saggio.

E' stato isolato un ceppo di Staphylococcus epidermidis, in seguito nominato SA 1545 - codice di identificazione secondo API 20 Staph 6704773, - da protesi aorto-bifemorale in paziente di sesso maschile.

Il ceppo presentava tendenza ad un marcato dimorfismo di colonia su piastre di agar-sangue. Su piastre di Mannitol Salt Agar risultava mannitolo negativo, con colonie di diametro 1 mm o meno dopo 18 ore di

incubazione.

Il ceppo isolato risultava inoltre sensibile ai seguenti antibiotici (saggio Kirbi Bauer): Gentamicina, Vancomicina, Ofloxacina, Eritromicina, Imipenem, Cefalotina, Amoxicillina + acido clavulanico, cefoperazone.

Il profilo biochimico del ceppo isolato è il seguente:

Fermentazione	Glucosio	+
Fermentazione	Fruttosio	+
Fermentazione	Maltosio	+
Fermentazione	Lattosio	+
Fermentazione	Trealosio	-
Fermentazione	Mannitolo	-
Fermentazione	Xilitolo	-
Fermentazione	Melibiosio	-
Produzione	nitrati	-
Fosfatasi	alcalina	-
Produzione di acetoina		+
Fermentazione	Raffinosio	-
Fermentazione	Xylosio	-
Fermentazione	Saccarosio	+
N-acetil glicosammidasi		-
Arginina di idrolasi		+
Ureasi		+

In altri casi sono stati isolati ceppi aventi caratteristiche simili ed idonei per l'uso nel saggio dell'invenzione.

Esempio 2 - Preparazione del terreno di cultura

1 litro di terreno contiene le seguenti sostanze:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4(2\text{H}_2\text{O})$	10 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g
Acido L-aspartico	150 mg
L-alanina	100 mg
L-arginina	100 mg
L-cistina	50 mg
Glicina	100 mg
Acido L-glutammico	150 mg
L-istidina	100 mg
L-isoleucina	150 mg
L-lisina	100 mg
L-leucina	150 mg
L-metionina	100 mg
L-fenilalanina	100 mg
L-prolina	150 mg
L-serina	100 mg
L-treonina	150 mg
L-triptofano	100 mg
L-tirosina	100 mg
L-valina	150 mg
Glucosio	10 g
$\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	500 mg
Biotina	0,1 mg
Acido nicotinico	2 mg
Acido D-pantotenico	2 mg
Piridossale	4 mg
Piridossammina	4 mg
Riboflavina	2 mg
Tiamina	2 mg
Adenina	20 mg

- segue -

Guanina	20 mg
$\text{CaCl}_2(6\text{H}_2\text{O})$	10 mg
$\text{MnSO}_4$	5 mg
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{FeSO}_4(6\text{H}_2\text{O})$	6 mg



La composizione del terreno corrisponde a quello descritto in Hussain, Hastings, White, J. Med. Microbiol. 34:143-147, 1991, con le seguenti modifiche per quanto attiene alla preparazione:

dopo aver pesato tutti i componenti del terreno, dapprima  $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$  viene sciolto in acqua distillata, poi vengono aggiunti tutti gli altri componenti singolarmente, mantenendo il terreno in costante agitazione. La L-cisteina prima dell'aggiunta deve essere sciolta in 2-3 gocce di NaOH 5N.

Una volta disciolti tutti i componenti, anche se rimane una minima quantità di precipitato, il terreno viene diluito con acqua distillata e sterilizzato per filtrazione attraverso membrane con porosità 0,2  $\mu\text{m}$ .

#### Esempio 3 - Preparazione del polisaccaride.

I ceppi vengono coltivati in 1000 ml di terreno HHW modificato per 6 giorni a 37°C in agitazione.

Il pellet cellulare viene raccolto per centrifugazione a 13.000 x g per 15 min, 4°C, sospeso in 20 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) fredda e congelato a -20°C per 2 h. La sospensione viene poi scongelata a temperatura ambiente e omogeneizzata (Sorvall) 10 impulsi, 30 secondi ciascuno, con intervalli di 30 secondi.

Si procede quindi a centrifugazione a 13.000 x g per 15 min a 4°C;

il sovranatante viene conservato a 4°C ed il pellet cellulare viene risospeso in un isovolume di soluzione fisiologica fredda e nuovamente sottoposto ad omogeneizzazione come in precedenza.

I campioni vengono poi nuovamente centrifugati a 13.000 x g per 15 min a 4°C, unendo il nuovo sovranatante a quello precedentemente messo da parte.

Il sovranatante così ottenuto viene dializzato contro 1000 volumi di H<sub>2</sub>O, con membrane di dialisi con "cut-off" 12 kDa, per 2 h, in modo da eliminare i sali dal campione, che viene quindi congelato a -80°C, liofilizzato e risospeso in 20 ml di TCA (acido tricloroacetico) al 5% (peso/volume). Dopo 15 min a 4°C, il campione viene centrifugato a 30.000 x g per 30 min a 4°C. Al sovranatante vengono aggiunti 4 volumi di etanolo assoluto freddo e la preparazione viene tenuta per 48 h a 4°C. Il polisaccaride grezzo viene raccolto a questo punto tramite centrifugazione a 20.000 x g per 30 min a 4°C; il precipitato viene lavato con 0,5 volumi di etanolo assoluto freddo, essiccato sotto vuoto (Hetovac) e sospeso in 2 ml di H<sub>2</sub>O distillata sterile. Il polisaccaride così preparato viene utilizzato per la sensibilizzazione dei pozzetti in idonee diluizioni (50 µl per pozzetto).

#### Esempio 4 - Esecuzione del metodo ELISA.

I pozzetti di una piastra da microtitolazione vengono sensibilizzati con 50 µl del polisaccaride preparato come descritto nell'Esempio 1, ad una diluizione 1:80, ed incubati per 18 ore a 4°C, dopo essere stati sigillati con nastro adesivo di polipropilene.

Dopo incubazione, i pozzetti vengono svuotati e lavati per 5 volte



con 100 µl di PBS contenente 0,05% di Tween 20.

Dopo il lavaggio, i pozzetti vengono saturati con 200 µl di latte di soia non diluito, e dopo essere stati sigillati, incubati a 37°C per 1 ora.

Dopo incubazione, i pozzetti vengono svuotati e lavati come descritto in precedenza.

I sieri da saggiare, inclusi un controllo positivo ed uno negativo, vengono diluiti 1:160 e 1:320 in latte di soia, poi distribuiti nei pozzetti in ragione di 50 µl per pozzetto.

I pozzetti vengono quindi sigillati ed incubati a 37°C per 1 ora.

Dopo incubazione i pozzetti vengono lavati come descritto in precedenza. Vengono quindi aggiunti 50 µl di "Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-human IgG" (ad esempio DAKO cod. P0214) per il saggio IgG e di "Peroxidase Conjugated Rabbit anti-Human IgM" (ad esempio DAKO cod. P215) diluiti in latte di soia rispettivamente 1:15.000 (IgG) e 1:1.500 (IgM). I pozzetti sigillati vengono poi incubati a 37°C per 1 ora; successivamente sono svuotati e lavati come descritto.

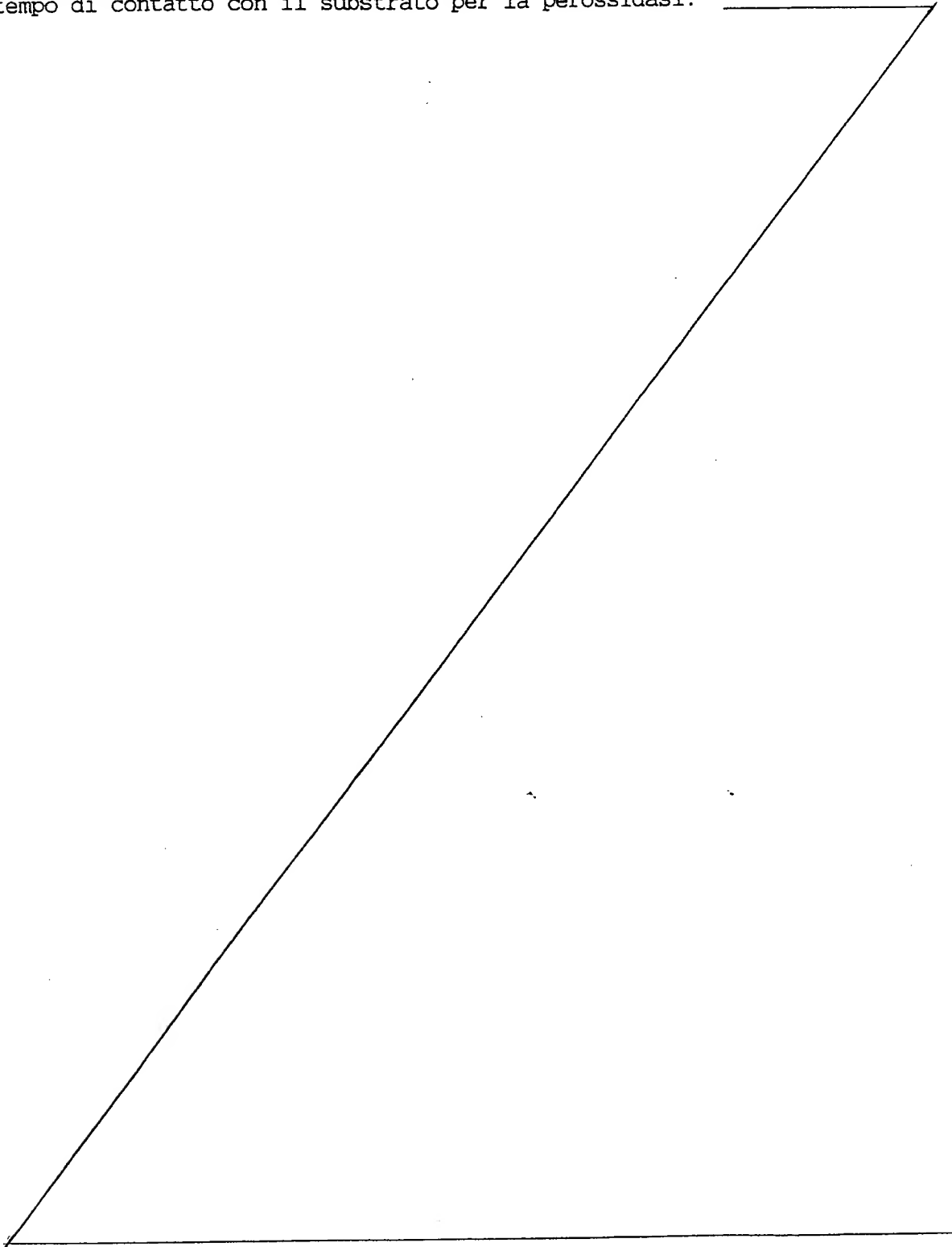
Dopo in tutti i pozzetti vengono aggiunti 50 µl di substrato cromogeno per perossidasi, ad esempio BM Blue PoD Substrate Boehringer Mannheim Cat. No. 1484281.

I pozzetti sono incubati a temperatura ambiente per 15-20 minuti. La reazione viene quindi bloccata con 50 µl di acido solforico 0,5 N.

Le piastre vengono quindi lette con un lettore di "microtiter" a  $\lambda$  = 450 nm, utilizzando come bianco un pozzetto non trattato, in cui vi sia solo acido solforico 0,5 N.

Come regola generale, le letture per i controlli positivo non dovrebbero superare OD 1,5, oltre la quale le letture non sono lineari.

In tale eventualità il saggio deve essere ripetuto, riducendo il tempo di contatto con il substrato per la perossidasi.



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la determinazione di infezioni da protesi condotto su campioni di sangue o altri fluidi biologici, caratterizzato dal fatto che viene determinata la presenza nel campione in esame di anticorpi diretti contro il polisaccaride prodotto da ceppi virulenti di stafilococco.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detti anticorpi sono IgG e IgM.
3. Metodo secondo le rivendicazioni 1 e 2, caratterizzato dal fatto che il ceppo virulento di Stafilococco è il ceppo depositato alla DSM n. 11942.
4. Metodo secondo le rivendicazioni 1-3, caratterizzato dal fatto che il polisaccaride è ottenuto con un procedimento che comprende i seguenti passaggi:
  - a- coltura dei microorganismi nel terreno HHW modificato secondo quanto specificato sopra, per un periodo variabile di 4-6 giorni.
  - b- omogeneizzazione delle cellule in tampone fisiologico
  - c- centrifugazione a 13.000 (g) per 15 min e separazione del surnatante
  - d- dialisi del surnatante con membrane a "cut-off" di 12 kDa
  - e- congelamento della soluzione ottenuta al punto (d) seguita da liofilizzazione della stessa
  - f- risospensione del liofilizzato in soluzione di acido tricloroacetico
  - g- centrifugazione a 30.000 x g della soluzione ottenuta al punto (f), separazione del surnatante e aggiunta di etanolo allo stesso
  - h- centrifugazione del surnatante trattato del punto (g) a 20.000 x g a



14.05.99

dare il polisaccaride grezzo

i- lavaggio del polisaccaride grezzo con etanolo assoluto, essiccamento sotto vuoto e risospensione in H<sub>2</sub>O sterile.

5. Metodo secondo le rivendicazioni 1-4, in forma di ELISA, immunoprecipitazione in gel, immunodiffusione, controimmunolettroforesi, RIA, fissazione del complemento.

6. Polisaccaride ottenibile con il procedimento della rivendicazione 4.

7. Kit per l'esecuzione del metodo delle rivendicazioni 1-5, contenente il polisaccaride, gli anticorpi o i reagenti di rivelazione in opportuni contenitori insieme a veicoli, eccipienti, additivi in grado di preservarne la stabilità.

8. Kit secondo la rivendicazione 7, contenente strip pre-sensibilizzate con l'antigene e i sieri di controllo positivo e negativo.

9. Uso di polisaccaride prodotto da ceppi virulenti di Staphylococcus epidermidis o da altre specie coagulasi positive e negative in un immunosaggio per la determinazione di infezioni da protesi.

10. Uso secondo la rivendicazione 9 del polisaccaride della rivendicazione 6.

Milano, 3 febbraio 1998

Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti - Bracco - Minoja s.r.l.

*F. Minoja*

